

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 754 182

(21) N° d'enregistrement national :
96 12191

(51) Int Cl⁶ : A 61 K 39/002, A 61 K 39/02, 39/12, 31/135, 33/30,
33/32, 33/42, 31/23, 9/113

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 07.10.96.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 10.04.98 Bulletin 98/15.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : SOCIETE D'EXPLOITATION DE
PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES
SEPPIC SOCIETE ANONYME — FR.

(72) Inventeur(s) : BOUT DANIEL, AUCOUTURIER
JEROME et GANNE VINCENT.

(73) Titulaire(s) : .

(74) Mandataire : L'AIR LIQUIDE SOCIETE ANONYME
POUR L'ETUDE ET L'EXPLOITATION DES
PROCEDES GEORGES CLAUDE.

(54) NOUVELLES COMPOSITIONS VACCINALES COMPORTANT COMME ADJUVANT UN COMPOSE SYMPATHOMIMETIQUE.

(57) Composition comprenant:

(i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés; et,

(ii) au moins un adjuvant, caractérisé en ce que ledit adjuvant contient au moins un composé sympathomimétique et leur utilisation comme médicament.

No EOS?

FR 2 754 182 - A1



La présente invention concerne de nouveaux adjuvants pour compositions vaccinales ainsi que des compositions comprenant au moins un antigène, notamment un antigène d'origine virale, bactérienne ou parasitaire et au moins un adjuvant.

L'utilisation d'adjuvants dans les compositions est connue depuis longtemps. Ces adjuvants ont pour objet principal de permettre l'augmentation de la réponse immunitaire. Ces adjuvants sont de natures diverses. Ils peuvent par exemple consister en des liposomes, des émulsions comprenant au moins une phase huile et au moins une phase aqueuse, du type adjuvants de Freund ou, de manière plus courante en des sels minéraux insolubles dans l'eau. Ces sels minéraux peuvent constituer par exemple en l'hydroxyde d'aluminium une nitrate de cérium, le sulfate de zinc, l'hydroxyde de fer colloïdal ou le chlorure de calcium. L'hydroxyde d'aluminium est l'adjuvant le plus couramment utilisé.

Ces adjuvants sont décrits notamment dans l'article de Rajesh K. Gupta et al "Adjuvants, balance between toxicity and adjuvanticity", Vaccine, vol. 11, Issue 3, 1993, pages 993-306.

L'immunisation locale est la voie la plus efficace pour induire une protection contre des agents pathogènes qui ont accès à l'organisme à travers les muqueuses. Néanmoins, la faible réponse immunitaire développée contre les antigènes administrés par cette voie exige l'emploi d'agents immunostimulants. L'adjuvant reconnu comme étant le plus puissant à stimuler l'immunité des muqueuses est la toxine cholérique, mais les effets toxiques qui lui sont associés restreignent son utilisation chez l'homme. Son efficacité semble corrélée avec la ribosylation de l'ADP sur une enzyme de type adénylate cyclase conduisant à une synthèse d'AMPc intracellulaire continue. Ces éléments de l'état de la technique sont connus et divulgués dans les publications suivantes : R.J. Jackson et Coll ; Infection and Immunity, oct. 1993, 4272-4279 ; Shin-ichi Tamura et Coll ; 1995, Vaccine 13, 339-341.

La demanderesse a donc cherché à développer des substances capables de moduler et/ou d'augmenter de manière transitoire le taux de messagers

intracellulaires, comme l'AMPc, pour augmenter la réponse immunitaire sans induire pour autant de toxicité vis-à-vis des sujets traités.

L'invention a pour objet une composition comprenant :

(i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé

5 comportant une séquence d'acides aminés ; et,

(ii) au moins un adjuvant,

caractérisée en ce que ledit adjuvant comprend au moins un composé sympathomimétique.

Par antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comportant une séquence d'acides aminés, on désigne soit des micro-organismes tués, tels que les virus, les bactéries ou les parasites, soit des fractions purifiées de ces micro-organismes, soit des micro-organismes vivants dont le pouvoir pathogène a été atténué ; on peut citer notamment un virus recombinant notamment un virus non enveloppé tel que les adénovirus, le 10 virus de la vaccine, le virus Canarypox, les herpès virus, les baculovirus ; on désigne aussi un vecteur recombinant viral non enveloppé vivant dont le génome contient, insérée de préférence dans une partie non essentielle pour la réplication du virus enveloppé correspondant, une séquence codant pour une sous-unité antigénique induisant une synthèse d'anticorps et/ou un effet 15 protecteur contre le susdit virus enveloppé ou micro-organisme pathogène ; ces sous-unités antigéniques peuvent être par exemple, une protéine, une glycoprotéine, un peptide, ou une fraction peptidique et/ou protectrice contre une infection par un micro-organisme vivant tel un virus enveloppé, une bactérie ou un parasite.

25 On peut citer notamment un plasmide recombinant constitué d'une séquence de nucléotide dans laquelle est insérée une séquence nucléotidique exogène, provenant d'un micro-organisme ou d'un virus pathogène. Cette dernière séquence nucléotidique a pour but de permettre l'expression d'un composé comportant une séquence d'acides aminés, ce composé ayant lui-même pour but de déclencher une réaction immune dans un organisme hôte ;

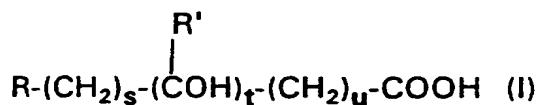
30 Par composés sympathomimétiques, on désigne notamment les amphétamines, les catécholamines, les phénylisopropylamines ou la tyramine.

Comme exemples de tels composés, on peut citer notamment l'isoprotérénol, la L-Epinephrine, le lévartérénol, l'éphédrine, la phényléphédrine ou le salbutamol.

Dans une première variante de la présente invention, celle-ci concerne 5 aussi une composition telle que définie précédemment comprenant, en outre, au moins un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau, ledit sel étant constitué d'un anion organique et d'un cation métallique. Un sel soluble dans l'eau au sens de la présente invention peut être tel que sa solubilité dans l'eau est supérieure ou égale à 10 g/l et, de préférence, comprise entre 10 et 10 2000 g/l. Le cation métallique constitutif dudit sel pharmaceutiquement acceptable est de préférence un cation bivalent avantageusement ce cation est 15 un cation d'un métal choisi dans le groupe constitué par le manganèse, le calcium et le zinc. Le manganèse est un métal tout particulièrement préféré dans le cadre de la présente invention. Il a en effet été constaté que ce sel pharmaceutiquement acceptable est soluble dans l'eau permet l'induction d'une réponse immune particulièrement importante tout en présentant une toxicité faible. L'anion organique constitutif dudit sel pharmaceutiquement acceptable est avantageusement un anion d'un composé comprenant au moins un groupe fonctionnel oxygéné de préférence un groupe phosphorique ou un 20 groupe carboxylique. L'acide glycérophosphorique est un anion à groupe phosphorique préféré. Les anions comprenant au moins un groupe carboxylique préféré sont dérivés de composés choisis parmi :

les oses acides de préférence des oses acides ayant de 5 à 7 atomes de carbone, plus préférentiellement ceux ayant 6 à 7 atomes de carbone, les 25 acides mono ou polycarboxyliques, les acides aminés.

Les acides mono ou polycarboxyliques préférés sont l'acide fumarique ou les composés de formule (I)



30 où R représente COOH, CH₃CO, CH₃ ou CH₂OH,

R' représente H ou COOH

et s, t et u, identiques ou différents sont compris entre 0 et 3.

Des composés de formule (I) préférés sont l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide tartrique, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide pyruvique.

Au sens de la présente invention, un ose acide consiste en un ose comprenant au moins une fonction carboxylique, un ose étant un glucide constitué par les sucres réducteurs. Ces oses acides sont avantageusement des dérivés d'aldoses, obtenus par oxydation de la fonction alcool primaire ou de la fonction aldéhydique en fonction carboxylique. De tels composés peuvent tout particulièrement consister en l'acide gluconique, l'acide glucuronique, l'acide fructoheptonique, l'acide gluconoheptonique, l'acide glucoheptonique. Lorsque l'anion organique est un dérivé d'un acide aminé, cet acide aminé peut être un acide α -aminé tel que l'acide glutamique, la méthionine et, tout particulièrement, l'acide aspartique.

Un sel pharmaceutiquement acceptable, soluble dans l'eau selon l'invention peut comprendre un cation polyvalent, notamment divalent, associé à un anion organique ou à plusieurs anions organiques de nature différente. Ainsi, à titre d'exemple, un cation bivalent tel le cation du calcium peut être associé à un anion dérivé de l'acide gluconoheptonique.

Une composition ainsi définie contient entre 0,02 et 3000 mg/ml, de préférence 0, 1 et 1000 mg/ml du sel minéral et, notamment, entre 0,1 et 20 150 mg/ml.

Dans une deuxième variante de l'invention, la composition telle que définie ci-dessus peut également contenir une huile. Dans un tel cas, la composition selon l'invention se présente avantageusement sous la forme d'un émulsion associant au moins une phase aqueuse et au moins une phase huile. 25 Cette émulsion peut être du type huile dans eau (H/E), eau dans huile (E/H), eau dans huile dans eau (E/H/E) ou microémulsion. On préfère cependant les émulsions E/H/E et H/E. Une telle émulsion peut être préparée selon les méthodes classiques de préparation d'une émulsion, notamment selon les procédés décrits dans les demandes de brevet EP-A-489 181 et 30 EP-A-481 982. Ainsi, on peut émulsionner sous agitation l'huile constitutive de la phase huile avec la phase aqueuse constituée d'une solution ou d'une suspension aqueuse contenant l'antigène.

Une émulsion selon l'invention peut comporter, en poids, de 5 à 95 % de phase huile pour 95 à 5 % de phase aqueuse et, de préférence, de 25 à 75 % de phase huile pour 75 à 25 % de phase aqueuse. L'émulsion doit être stable de préférence pendant au moins 12 mois quand elle est stockée à 4°C.

5 Les huiles, constituées de ladite phase huileuse pouvant être utilisées dans la composition selon l'invention sont avantageusement des huiles fluides choisies parmi les huiles minérales naturelles ou synthétiques, ou les huiles non minérales d'origine végétale, animale ou synthétique connues pour leur absence ou leur faible toxicité.

10 Elles doivent être liquides à la température de stockage (+4°C) ou au moins donner des émulsions liquides à cette température. On choisira en particulier des huiles minérales à chaîne linéaire ayant un nombre d'atomes de carbone de préférence supérieur à 16 et exempte de composés aromatiques. Des exemples connus sont le MARCOL 52 et le DRAKEOL 6VR. On peut 15 également utiliser des huiles synthétiques telles que les polyisobutènes ou les polyisopropènes. Parmi les huiles végétales, on choisira les huiles insaturées riches en acide oléique qui sont biodégradables, par exemple les huiles d'arachide, d'olive, de sésame, de soja ou de germes de blé. Pour les huiles animales, les mêmes critères de tolérance et d'efficacité immunitaire sont 20 requises. A titre d'exemple comme huiles animales, on peut citer le squalane ou l'huile de spermaceti. A titre d'huile non minérale synthétique, on peut encore citer les esters d'alcools et d'acides gras tels que, par exemple, l'oléate d'éthyle, le myristate d'isopropyle, les mono di ou triglycérides, les esters de propylène glycol, les glycérides partiels, tels que les glycérides d'huile de maïs 25 comme ceux commercialisés sous le nom de LANOL par la Société SEPPIC, la maïsine, ou l'oléate d'oléyle. Par ailleurs, la composition selon l'invention quand elle se présente sous forme d'une émulsion telle que définie plus haut, peut également avantageusement comporter un ou plusieurs agents tensioactifs émulgateurs. Ce dernier présente un caractère lipophile ou 30 hydrophile caractérisé par une valeur HLB (hydrophile-lipophile-balance) comprise entre 1 et 19.

Un tel tensioactif peut consister en

- un alkylpolyglycoside ou un mélange d'alkylpolyglycosides de formule R_a-(O)-Zn où R_a représente un radical aliphatique saturé, linéaire ou ramifié, comprenant de 4 à 24 atomes de carbone, Z est le reste d'un sucre, de préférence le glucose et n est compris entre 1 et 5 de préférence entre 1,1 et 2.

- les saponines,

- les lécithines,

- les alcanols polyoxyéthylés, tels que ceux commercialisés sous la désignation BRIJ par la société ICI,

- les polymères comprenant des blocs polyoxyéthylènes et polyoxypropylènes, tels que ceux commercialisés sous la désignation PLURONICS par la société BASF.

Des tensioactifs particulièrement préférés sont les esters de polyéthylèneglycol, obtenus par condensation d'un acide gras, notamment un acide gras liquide à 20°C avec un polyéthylèneglycol de poids moléculaire compris entre 80 et 200 ; un tel tensioactif est commercialisé par la Société SEPPIC sous la marque SIMULSOL 2599.

Un autre agent tensioactif préféré dans le cadre de la présente invention consiste en un ester obtenu par condensation d'un acide gras, avantageusement un acide gras liquide à 20°C avec un sucre, le sorbitol ou du glycérol. Ledit sucre peut consister en glucose, saccharose ou, de préférence, mannitol. A titre d'ester de mannitol particulièrement préféré, on peut citer des oléates de mannitol obtenus par anhydrisation de la chaîne carbonée polyhydroxylée du mannitol qui se cyclise en 1-4 ou en 2-6.

Des dérivés de ces esters de sucre de polyéthylèneglycol, de sorbitol ou de glycérol peuvent être également mis en oeuvre. Ces dérivés présentent une hydrophilie modifiée notamment par greffage de fonctions hydrophiles telles que alcool, polyol, oxyde d'éthylène, oxyde de propylène, acide carboxylique, amine ou amide. De tels dérivés peuvent par exemple consister en des esters gras de sorbitane polyoxyéthylés, tels le TWEEN.

Les autres types de tensioactifs préférés consistent en des huiles végétales éthoxylés, telles que, par exemple l'huile de ricin polyéthoxylée, cette huile étant hydrogénée ou non, ou des esters de polyglycerol, notamment des esters de polyglycérol d'acides gras naturels tels que l'acide oléique, l'acide stéarique, l'acide ricinoléique ou l'acide isostéarique et, particulièrement, des ricinoléates ou des polyricinoléates de polyglycérol.

Un agent tensioactif selon l'invention est de préférence pharmaceutiquement acceptable au niveau des muqueuses ; il doit notamment être dépourvu de métaux lourds et présenter des indices d'acides ou de peroxydes très faibles. Il est également souhaitable qu'il satisfasse les normes de tests d'innocuité tels que par exemple, ceux décrits par S.S. Berllin, *Annales of Allergy*, 1962, 20, 473 ou les tests de toxicité anormale décrits dans la pharmacopée européenne. Préférentiellement, l'agent tensioactif est associé à l'adjuvant huileux avant formation de l'émulsion.

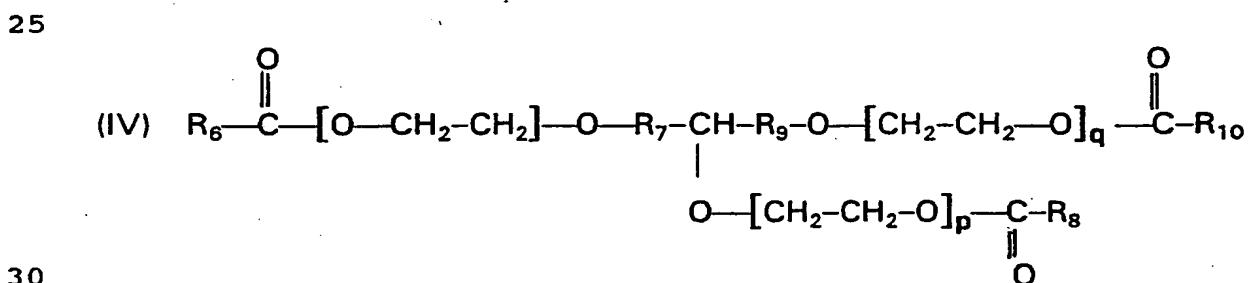
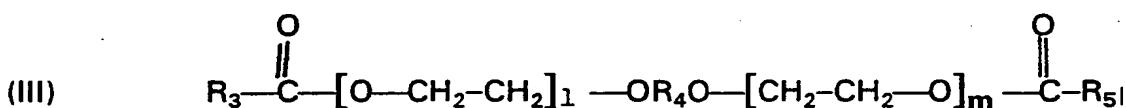
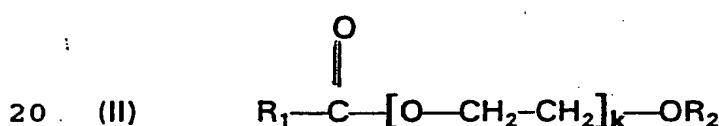
La concentration en agent tensioactif dans la composition telle que définie précédemment peut être comprise entre 0,01 et 500 mg/ml, et, de préférence, entre 0,1 et 200 mg/ml.

Des huiles associées avec un agent tensioactif (ester de mannitol) convenant tout particulièrement dans le cadre de la présente invention sont celles commercialisées par la Société SEPPIC sous la marque MONTANIDE. La nature de ces huiles, le type d'émulsion qu'elles permettent d'obtenir et les caractéristiques (viscosité et conductivité) de ces émulsions sont décrites dans la demande internationale WO94/16681, publiée le 4 août 1994 et, notamment, page 11, tableau I. Ces compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour le traitement des maladies humaines ou vétérinaires. Elles permettent notamment de soulager les maladies infectieuses avec agent intracellulaire, notamment les maladies respiratoires, les maladies infectieuses opportunistes et dans le cadre de la médecine vétérinaire les maladies infectieuses des poissons.

La composition selon l'invention peut contenir aussi des substances modulatrices de l'immunité.

L'adjuvant huileux peut encore consister en une huile auto-émulsionnable, c'est-à-dire une préparation huileuse capable de former une émulsion stable avec une phase aqueuse, pratiquement sans apport d'énergie, par exemple par dispersion dans la phase aqueuse par agitation mécanique lente. A ce titre, on peut citer des huiles auto-émulsionnables telles connues dans la pharmacopée européenne sous les désignations Labrafil et Simulsol. Ces huiles sont des glycérides polyglycosés.

Des huiles auto-émulsionnables préférées sont celles décrites dans la demande de brevet français N° 9500497 déposée le 18 Janvier 1995, au nom 10 de la Demandenderesse, intitulée "utilisation d'esters d'acides gras éthoxylés comme composants auto-émulsionnables notamment utiles pour la préparation de compositions phytosanitaires ou de médicaments à usage vétérinaire ou humain", dont référence est intégrée à la présente description. Ces huiles consistent en des esters d'acides gras éthoxylés répondant à l'une des 15 formules suivantes :



30 dans lesquelles :

- R₁, R₃, R₅, R₆, R₈ et R₁₀ représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 5 à 30 atomes de carbone ;

- R₂, R₄, R₇ et R₉ représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 1 à 5 atomes de carbone ;

le nombre total de molécules d'oxyde d'éthylène respectivement représenté dans les formules II, III et IV précitées par k, l+m, n+p+q étant un
5 nombre entier tel que la valeur HLB (balance hydrophile-lipophile) desdits composés soit comprise entre environ 4 et environ 10, de préférence entre environ 5 et environ 9.

R₁ est de préférence choisi parmi les restes des acides palmitique, stéarique, ricinoléique, oléique, linoléique et linolénique et R₂ représente un
10 radical méthyle et k est un nombre entier compris entre 1 et 5, de préférence égal à 2, et par ailleurs, les esters d'acides gras éthoxylés de formule III préférés sont ceux où :

(i) - R₆, R₈ et R₁₀ représentent des chaînes hydrocarbonées ayant de 16 à 22 atomes de carbone correspondant notamment aux chaînes grasses de
15 l'huile de colza, de maïs, de soja, d'arachide et de noyaux d'abricots ;

- R₇ et R₉ représentent un groupe méthylène CH₂ ;

- n, p, q représentent des nombres entiers tels que leur somme soit comprise entre 3 et 30, et de préférence égale à 20 ; ou

(ii) - R₆, R₈ et R₁₀ représentent des chaînes hydrocarbonées
20 correspondant aux chaînes grasses de l'huile de ricin ;

- R₇ et R₉ représentent un radical méthylène CH₂ ;

- n, p, q représentent des nombres entiers tels que leur somme soit comprise entre 5 et 7.

La concentration en huile auto-émulsionnable dans la composition
25 selon l'invention peut être comprise entre environ 5 et 700 g/l, de préférence entre environ 10 et 500 g/l.

Outre la phase huile et la phase aqueuse, la composition selon l'invention peut comporter un agent stimulant immunitaire conventionnel tel l'Avridine®, soit la N,N-dioctadecyl-N',N' - bis (2-hydroxyéthyl)
30 propanediamine, les dérivés du MDP (muramyl dipeptide) notamment le threonyl-MDP, les dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du Lipide A.

La composition selon l'invention peut comprendre encore un ou plusieurs agents tensioactifs, en l'absence de tout adjuvant huileux.

La composition se présente alors sous la forme d'une solution micellaire. Celle-ci peut être préparée par simple mélange de l'agent tensioactif avec une dispersion dans l'eau de l'antigène ou du générateur d'antigène in vivo.

L'agent tensioactif peut être choisi parmi les agents tensioactifs décrits plus haut, en association avec un adjuvant huileux.

10 Ladite solution micellaire peut comporter de 0,5 à 500 mg/ml, de préférence de 1 à 250 mg/ml en agent tensioactif.

Une composition selon la présente invention peut comprendre un antigène tel qu'un virus, un micro-organisme, plus particulièrement une bactérie ou un parasite, ou un composé comprenant une chaîne peptidique. Un tel composé peut consister une protéine ou une glycoprotéine, notamment une protéine ou une glycoprotéine issues d'un micro-organisme, un peptide synthétique ou une protéine ou un peptide issu du génie génétique. Lesdits virus et micro-organisme peuvent être totalement inactivés ou vivants atténués. A titre de virus pouvant constituer un antigène selon la présente invention, on peut citer le virus de la rage, les herpèsvirus tels que le virus de la maladie d'Aujeszky, les orthomixovirus tels que Influenzae, les picornavirus tels que le virus de la fièvre aphteuse ou les rétrovirus tels que les VIH. A titre de micro-organisme du type bactérien pouvant constituer un antigène selon la présente invention, on peut citer E. coli, et ceux des genres Pasteurella, Furunculosis, Vibriosis, Staphylococcus et Streptococcus. A titre de parasite, 20 on peut citer ceux des genres Trypanosoma, Plasmodium et Leishmania.

Une composition selon l'invention comprend une concentration en antigène qui dépend de la nature de cet antigène et de la nature du sujet traité. Il est toutefois particulièrement remarquable qu'un adjuvant selon l'invention, associé ou non à un adjuvant huileux et/ou un agent tensioactif 30 tels que définis plus haut, permet de diminuer d'une façon notable la dose habituelle d'antigène requise. La concentration adéquate d'antigène peut être déterminée de manière classique par l'homme du métier. Généralement, cette

dose est de l'ordre de 0,1µg/ml à 1g/ml plus généralement comprise entre 1 µg/ml et 100mg/ml.

Une composition selon l'invention peut aussi comprendre un générateur *in vivo* d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, c'est-à-dire un composé biologique capable d'exprimer un tel composé dans l'organisme hôte dans lequel on a introduit ledit générateur *in vivo*. Le composé comprenant la séquence d'acides aminés, peut être une protéine, un peptide ou une glycoprotéine.

Ces générateurs *in vivo* sont généralement obtenus par des procédés issus du génie génétique.

Plus particulièrement, ils peuvent consister en des micro-organismes vivants, généralement un virus, jouant le rôle de vecteur recombinant, dans lequel est insérée une séquence nucléotidique, notamment un gène exogène. Ces composés sont connus en tant que tels et utilisés notamment comme vaccin sous unitaire recombinant.

A cet égard, on peut se référer à l'Article de M. ELOIT et al., Journal of virology (1990) 71, 2925-2431 dans la demande internationale WO-A-91/00107 ou à la demande internationale WO-A-94/16681.

Avantageusement, le micro-organisme constitutif d'un vaccin sous-unitaire recombinant est un virus recombinant non enveloppé, par exemple choisi parmi les adénovirus, le virus de la vaccine, le canarypox virus, les herpès virus ou les baculovirus. Le gène exogène inséré dans le micro-organisme peut être, par exemple, issu d'un virus Aujeszky ou HIV.

Les générateurs *in vivo* selon l'invention peuvent aussi consister en un plasmide recombinant comprenant une séquence nucléotidique exogène, capable d'exprimer dans un organisme hôte un composé comprenant une séquence d'acides aminés. De tels plasmides recombinants et leur mode d'administration dans un organisme hôte ont été décrits en 1990, par LIN et al., Circulation 82:2217,2221 ; COX et al., J. of VIROL, Sept. 1993, 67, 9, 5664-5667 et dans la demande internationale WO/FR 95/00345 du 21 Mars 1995, au nom de la Demandante, intitulée "Une composition comprenant un plasmide recombinant et ses utilisations comme vaccin et médicament".

Selon la nature de la séquence nucléotidique comprise dans le générateur *in vivo*, le composé comprenant la séquence d'acides aminés qui est exprimé au sein de l'organisme hôte, peut :

5 (i) être un antigène, et permettre le déclenchement d'une réaction immune,

(ii) avoir une action curative vis-à-vis d'une maladie essentiellement une maladie d'ordre fonctionnel, qui s'est déclenchée chez l'organisme hôte. Dans ce cas, le générateur *in vivo* permet un traitement de l'hôte, du type thérapie génique.

10 A titre d'exemple, une telle action curative peut consister en une synthèse par le générateur *in vivo* de cytokine, comme les interleukines, notamment l'interleukine 2. Celles-ci permettent le déclenchement ou le renforcement d'une réaction immune visant à l'élimination sélective des cellules cancéreuses.

15 La concentration en ledit générateur *in vivo* dans la composition selon l'invention dépend, là encore, notamment de la nature dudit générateur et de l'hôte dans lequel il est administré. Cette concentration peut être aisément déterminée par l'homme du métier, sur la base d'expérience de routine.

20 A titre indicatif, on peut toutefois préciser que lorsque le générateur *in vivo* est un microorganisme recombinant, sa concentration dans la composition selon l'invention peut être comprise entre 10^2 et 10^{15} micro-organismes/ml, de préférence entre 10^5 et 10^{12} micro-organismes/ml.

25 Lorsque le générateur *in vivo* est un plasmide recombinant, sa concentration dans la composition selon l'invention peut être comprise entre 0,01 et 100 g/l.

30 Une composition selon l'invention peut être utilisée comme médicament préventif ou curatif. Selon la nature de l'antigène ou du générateur *in vivo*, une composition selon l'invention peut être administrée à des poissons, des crustacés tels que les crevettes, des volailles, notamment, des oies, des dindes, des pigeons et des poulets, aux canidés tels le chien, aux félidés tels le chat, aux porcs, aux primates, aux bovidés, aux ovidés et

aux chevaux, pour traiter par exemple la toxoplasmose ovine ou le pou du saumon. La composition selon l'invention comprenant au moins un composé sympathomimétique tel que défini ci-dessus, peut être également administrée à l'homme. L'administration de la composition peut se faire de manière classique par 5 voie parentérale, notamment par injection sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale ou par voie mucosale notamment par voie orale, voie rectale, voie nasale, voie vaginale.

Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci consiste en l'utilisation d'un adjuvant consistant en un composé sympathomimétique tel que défini ci-dessus 10 pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie infectieuse, notamment une maladie infectieuse engendrée par un virus ou un micro-organisme tels ceux mentionnés plus haut.

Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci consiste en l'utilisation de cet adjuvant pour la préparation d'une composition destinée à soigner une maladie 15 d'ordre fonctionnel, telle le cancer ou la mucoviscidose.

Dans l'une ou l'autre de ces utilisations, ledit adjuvant peut être associé à un sel pharmaceutiquement acceptable, soluble dans l'eau et/ou à un adjuvant huileux, un agent tensioactif ou à un adjuvant huileux lui-même associé à un agent tensioactif ; ces adjuvants huileux et tensioactifs étant tels que définis plus haut.

20 Des compositions adjuvantes comprenant ledit composé sympathomimétique, ledit sel pharmaceutiquement acceptable et l'adjuvant huileux et/ou les tensioactifs précités constituent encore un autre aspect de l'invention. Le cas échéant, ces compositions adjuvantes comprenant une phase aqueuse au moins.

25 Dans ce dernier cas, les compositions adjuvantes selon l'invention, comprenant au moins un adjuvant huileux, et, le cas échéant, un tensioactif, peuvent se présenter sous la forme d'une émulsion. Cette dernière peut être du type E/H, H/E, E/H/E ou microémulsion.

Ces émulsions peuvent comprendre en poids, de 0,5 % à 99,5 % de 30 phase huile pour 99,5 % à 0,5 % de phase aqueuse, de préférence, de 5 à 95 % de phase huile pour 95 à 5 % de phase aqueuse et, plus

préférentiellement, de 25 à 75 % de phase huile pour 75 à 25 % de phase aqueuse.

Le cas échéant, elles peuvent comprendre de 0,01 à 500 mg/ml, de préférence de 0,1 à 200 mg/ml d'un tensioactif au moins.

5 Lorsque la composition adjuvante selon l'invention ne comprend, outre le composé sympathomimétique, éventuellement le sel pharmaceutiquement acceptable et une phase aqueuse, qu'un ou plusieurs tensioactifs, elle se présente alors sous la forme d'une solution micellaire. La teneur en tensioactif de cette solution micellaire peut être comprise entre
10 0,01 et 900 mg/ml, de préférence entre 1 et 250 mg/ml.

Une composition adjuvante selon l'invention comprend habituellement le composé sympathomimétique à une concentration de 10^{-10} molaire à 10^{-2} molaire de préférence de 10^{-7} Molaire à 10^{-5} Molaire. Lorsqu'elle contient un sel pharmaceutiquement acceptable tel que défini
15 précédemment, c'est à une concentration de 0,02 à 3000 mg/ml, de préférence 0,1 à 1000 mg/ml, plus préférentiellement de 0,1 à 150 mg/ml.

Ces compositions adjuvantes sont utiles pour préparer les compositions selon l'invention.

20 Ces dernières peuvent alors être préparées par simple mélange de la composition adjuvante avec une composition comprenant un antigène ou un générateur *in vivo* d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés.

L'exemple suivant permet de mettre en évidence les propriétés des compositions selon la présente invention.

Exemple : mise en évidence du récepteur β -adrénergique sur les cellules
25 cibles de la toxine cholérique dans le système immunitaire des muqueuses. Le premier pas avant de tester le potentiel adjuvant des agonistes β -adrénergiques a été la mise en œuvre en évidence du récepteur sur les cellules impliquées dans l'immunité des muqueuses, notamment dans les cellules cibles de la toxine cholérique au niveau de la muqueuse intestinale de
30 la souris et la démonstration du couplage fonctionnel de ce récepteur à son effecteur l'enzyme adenylylate cyclase. Dans ce but, nous avons mesuré, parallèlement, la production d'AMPc par quatre populations cellulaires après

stimulation par différentes concentrations de toxine cholérique et d'un agoniste β -adrénergique, l'isoprotérénol.

Les populations cellulaires étudiées ont été les entérocytes (lignée cellulaire MODE-K), les lymphocytes des plaques de PEYER (LPP), les lymphocytes des ganglions mésentériques (LGM) et les lymphocytes intra-épitheliaux (LIE).

Les résultats montrent que tous les types étudiés répondent de manière plus ou moins intense à la stimulation par la toxine cholérique (voir figure 1), avec des index de stimulation de la production d'AMPc qui vont de 30 fois pour les entérocytes à 2 fois pour les lymphocytes de plaques de PEYER. Cette stimulation commence en général à partir de 10 ng/ml.

A l'exception des lymphocytes des plaques de PEYER tous les types cellulaires étudiés ont répondu à la stimulation β -adrénergique (figure 1), avec des index de stimulation allant de 3 fois pour les entérocytes à 1,5 fois pour les lymphocytes de ganglions mésentériques et les lymphocytes intra-épitheliaux. Dans tous les cas, la stimulation par l'isoprotérénol est observée à partir de 100nM. La production d'AMPc observée, est bien due à la stimulation du récepteur β -adrénergique, car elle est totalement inhibée par le propanolol, un antagoniste spécifique.

Il a ainsi été démontré la présence de récepteurs β -adrénergiques fonctionnels sur les entérocytes, les lymphocytes des ganglions mésentériques et les lymphocytes intra-épitheliaux. Il existe une co-localisation du récepteur de la toxine cholérique et du récepteur β -adrénergique sur trois des quatre populations cellulaires étudiées, ce qui nous a conduit à tester le potentiel adjuvant des agonistes β -adrénergiques montrent en définitive les avantages de compositions selon la présente invention contenant au moins un composé sympathomimétique adjuvant.

REVENDICATIONS**1. Composition comprenant :**

(i) au moins un antigène ou au moins un générateur in vivo d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés; et,

5 (ii) au moins un adjuvant,

caractérisée en ce que ledit adjuvant contient au moins un composé sympathomimétique.

10 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé sympathomimétique est une sympathomimétique amine telle qu'une catécholamine, une amphétamine, une phénylesopropylamine ou la tyramine.

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que le composé sympathomimétique est choisi parmi l'éphédrine ou l'isoprotérénol, la L-Epinephrine, le lévartérénol, l'éphédrine, la phényléphédrine ou le salbutamol.

15 4. Composition telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'adjuvant comprend en outre au moins un sel pharmaceutiquement acceptable et soluble dans l'eau, ledit sel étant constitué d'un anion organique et d'un cation métallique.

20 5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le cation métallique est divalent et choisi dans le groupe constitué par les cations du zinc, du manganèse et du calcium.

6. Composition selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisée en ce que l'anion organique est dérivé d'un composé comprenant au moins un groupe fonctionnel oxygéné.

25 7. Composition selon la revendication 6, caractérisé en ce que le groupe fonctionnel est un groupe carboxylique ou un groupe phosphorique.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'anion organique est dérivé d'un composé choisi dans le groupe constitué par les acides aminés, les oses acides comprenant de 5 à 7 atomes de carbone, et l'acide glycérophosphorique.

30 9. Composition selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'acide aminé est l'acide aspartique.

10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'ose acide est choisi dans le groupe constitué par l'acide gluconique, l'acide fructoheptonique et l'acide glucoheptonique.

11. Composition selon la revendication 10, caractérisée en ce que le 5 sel pharmaceutiquement acceptable est le gluconate de manganèse.

12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une émulsion comprenant au moins une phase aqueuse et au moins une phase huile, la phase huile étant constituée par un adjuvant.

10 13. Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce que l'émulsion est du type E/H/E, H/E ou microémulsion.

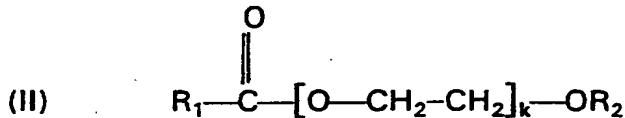
14. Composition selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est associé à un agent tensioactif, de préférence un agent tensioactif choisi parmi un ester obtenu par condensation 15 d'un acide gras avec un sucre, un polyéthylèneglycol, le sorbitol du glycérol, ou un dérivé d'un tel ester dont l'hydrophilie a été modifiée, une huile végétale éthoxylée ou leurs mélanges.

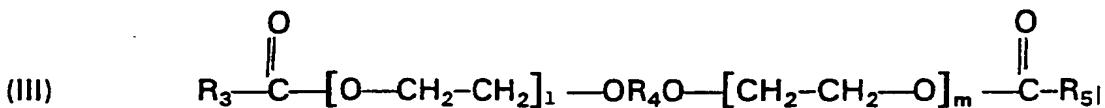
15. Composition selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est associé à un agent tensioactif 20 choisi parmi les esters de polyglycérol, notamment un ester de polyglycérol d'acides gras naturels et, de préférence, les ricinoléates ou les polycricinoléates de polyglycérol ou constituant en des huiles de ricin polyéthoxylées hydrogénées ou non.

16. Composition selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est une huile auto-émulsionnable. 25

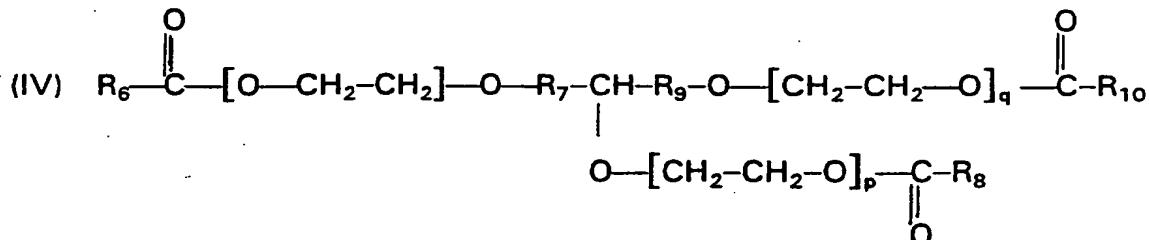
17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que l'adjuvant huileux est un ester d'acides gras éthoxylés répondant à l'une des formules suivantes :

30





5



10

dans lesquelles :

- R_1 , R_3 , R_5 , R_6 , R_8 et R_{10} représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 5 à 30 atomes de carbone ;

- R₂, R₄, R₇ et R₉ représentent une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée ayant de 1 à 5 atomes de carbone ;

le nombre total de molécules d'oxyde d'éthylène respectivement représenté dans les formules II, III et IV précitées par k , $l+m$, $n+p+q$ étant un nombre entier tel que la valeur HLB (balance hydrophile-lipophile) desdits composés soit comprise entre environ 4 et environ 10, de préférence entre environ 5 et environ 9.

18. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un agent tensioactif, ladite composition se présentant sous la forme d'une solution micellaire.

19. Composition selon la revendication 18, caractérisée en ce que
l'agent tensioactif est soit un ester obtenu par condensation d'un acide gras
avec un sucre ou du glycérol, ou un dérivé d'un tel ester dont l'hydrophilie a
été modifiée ou soit une huile végétale éthoxylée

20. Composition selon l'une des revendications 1 à 19, comprenant
en outre un stimulant immunitaire tel que l'Avridine®, les dérivés du MDP, les
30 dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du lipide A.

21. Composition selon l'une des revendications 1 à 20, pour la mise en oeuvre d'une méthode de traitement du corps humain ou animal.

22. Médicament selon la revendication 21 destiné à traiter ou à prévenir les maladies infectieuses et/ou fonctionnelles et notamment les maladies engendrées par un virus, un microorganisme ou un parasite.

23. Médicament selon la revendication 21 destiné à traiter ou à prévenir les maladies respiratoires.

24. Médicament selon la revendication 21 destiné à traiter la maladie d'Aujeszky chez les porcs, la toxoplasmose ovine ainsi que les maladies des poissons tel que le pou du saumon ou les maladies des crustacés.

25. Adjuvant tel que défini à l'une des revendications 4 à 19.

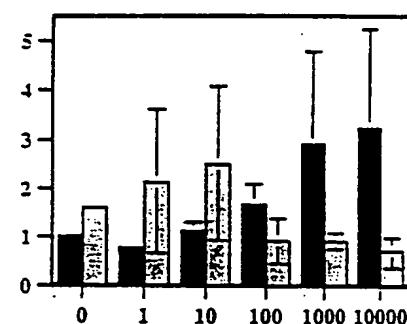
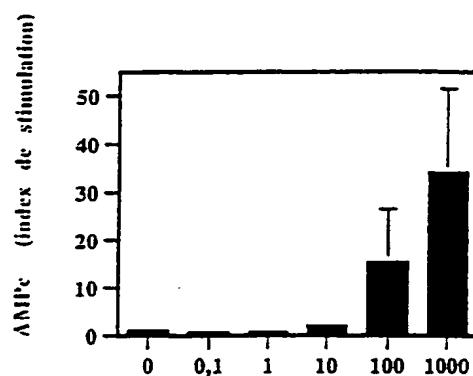
26. Utilisation de l'adjuvant tel que défini à l'une des revendications 1 à 19 pour la fabrication de vaccins destinés à la vaccination muqueuse, notamment orale, nasale, rectale ou vaginale.

27. Composition adjuvante comprenant une phase aqueuse, un adjuvant huileux, un tensioactif, éventuellement un sel constitué d'un anion organique et d'un cation métallique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un composé sympathomimétique.

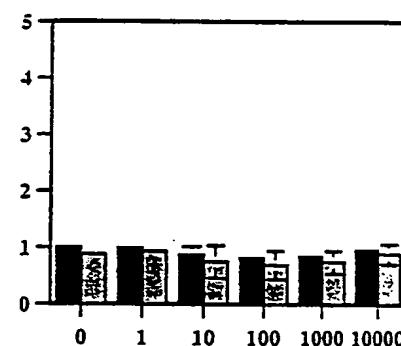
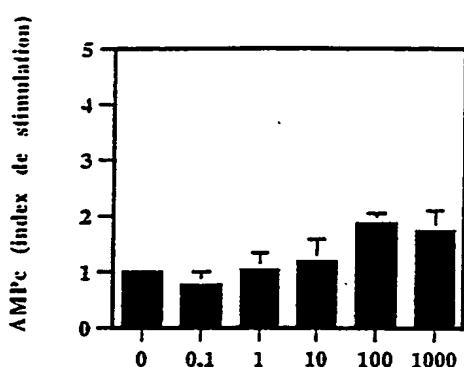
28. Composition selon la revendication 27 sous forme d'un émulsion E/H/E ou H/E.

FIGURE 1

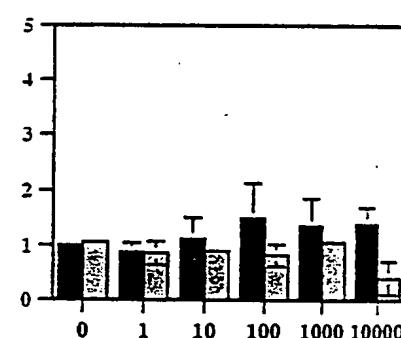
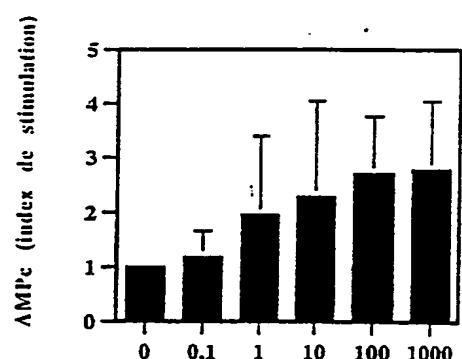
ENTEROCYTES



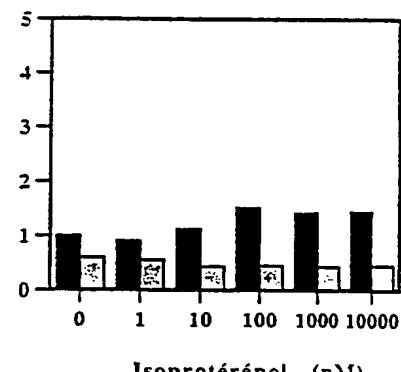
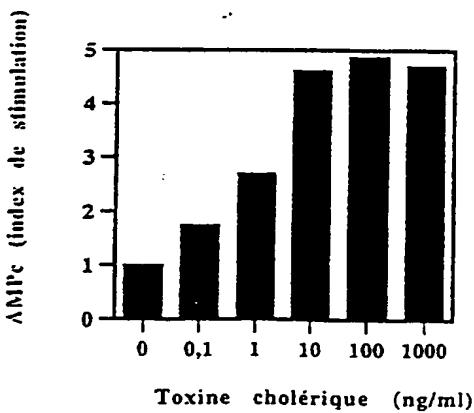
LPP



LGM



LIE



■ Isoprotérénol
▨ Isoprotérénol + Propranolol 10 µM

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREN° d'enregistrement
nationalétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 535173
FR 9612191

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|--|---|--|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| E | WO 96 32964 A (SEPPIC SA ;GANNE VINCENT (FR)) 24 Octobre 1996 * page 2, ligne 17 - page 13, ligne 34 * | 4-26 |
| A | EP 0 445 710 A (BEHRINGWERKE AG) 11 Septembre 1991 --- | |
| A,D | WO 95 25542 A (SOC D EXPL DE PRODUITS POUR L ;GANNE VINCENT (FR)) 28 Septembre 1995 --- | |
| A,D | WO 94 16681 A (SOC D EXPL DE PRODUITS POUR LE ;GANNE VINCENT (FR)) 4 Août 1994 --- | |
| A,D | WO 96 22109 A (SOC D EXPL DE PRODUITS POUR LE ;TROUVE GERARD (FR)) 25 Juillet 1996 ----- | |
| DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CI.6) | | |
| A61K | | |
| 1 | Date d'achèvement de la recherche 4 Juillet 1997 | Examinateur Rempp, G |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire | | |
| T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | | |